

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 15 mai 2001 (15.05.01)	
Demande internationale no PCT/FR00/02072	Référence du dossier du déposant ou du mandataire I/BP/CC
Date du dépôt international (jour/mois/année) 19 juillet 2000 (19.07.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 20 juillet 1999 (20.07.99)
Déposant ROUSSEL, Edmond, Daniel etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

12 février 2001 (12.02.01)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI
 34, chemin des Colombettes
 1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Antonia Muller

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire I/BP/CC	POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER	
Demande internationale n° PCT/FR 00/ 02072	Date du dépôt international (jour/mois/année) 19/07/2000	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 20/07/1999
Déposant LABORATOIRES STANDA S.A.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

☐ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☒ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

**UTILISATION DE BACTERIES PROPIONIQUES POUR LA PRODUCTION D'ACIDE PROPIONIQUE
ET/OU DE PROPIONATES DANS LE COLON**

5. En ce qui concerne l'**abrégi**,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure **des dessins** à publier avec l'abrégi est la Figure n°

☐ suggérée par le déposant.

☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒ Aucune des figures n'est à publier.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61K35/74 A23L1/308 A61P1/00 A61P31/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 A61K A23C A23L

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, CHEM ABS Data, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 741 509 A (LABORATOIRES STANDA) 30 mai 1997 (1997-05-30) page 12 -page 13	1
A	WO 98 27991 A (LABORATOIRES STANDA) 2 juillet 1998 (1998-07-02) page 27 -page 28 --- -/--	1-11

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

28 décembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

04/01/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Moreau, J

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>KANEKO T ET AL: "GROWTH STIMULATOR FOR FIFIDOBACTERIA PRODUCED BY PROPIONIBACTERIUM FREUDENREICHII AND SEVERAL INTESTINAL BACTERIA"</p> <p>JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, US, AMERICAN DAIR SCIENCE ASSOCIATION. CHAPAIN, ILLINOIS, vol. 77, no. 2,</p> <p>1 janvier 1994 (1994-01-01), pages 393-404, XP000590802</p> <p>ISSN: 0022-0302</p> <p>le document en entier</p> <p>---</p>	1-11
X	<p>DATABASE CHEMABS 'en ligne!</p> <p>CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US;</p> <p>MANTERE-ALHONEN, S.: "Propionibacteria used as probiotics - a review"</p> <p>retrieved from STN</p> <p>Database accession no. 124:143825 HCA</p> <p>XP002139247</p> <p>abrégé</p> <p>& LAIT (1995), 75(4-5), 447-52,</p> <p>---</p>	1-11
A	<p>DATABASE FSTA 'en ligne!</p> <p>INTERNATIONAL FOOD INFORMATION SERVICE (IFIS), FRANFURT/MAIN, DE;</p> <p>CRESCI A ET AL: "The effect of sucrose or starch-based diet on short-chain fatty acids and faecal microflora in rats."</p> <p>Database accession no. 1999-00-a0963</p> <p>XP002139248</p> <p>abrégé</p> <p>& JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY,</p> <p>86,(2) 245-250 1999</p> <p>-----</p>	1-11

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2741509 A	30-05-1997	FR 2741510 A	30-05-1997
		AU 7699696 A	19-06-1997
		BR 9611609 A	28-12-1999
		CA 2235709 A	05-06-1997
		EP 0863763 A	16-09-1998
		WO 9719689 A	05-06-1997
		JP 2000502247 T	29-02-2000
		PL 326982 A	09-11-1998
WO 9827991 A	02-07-1998	FR 2764801 A	24-12-1998
		FR 2764802 A	24-12-1998
		AU 5669098 A	17-07-1998
		BR 9714179 A	29-02-2000
		CN 1245432 A	23-02-2000
		EP 0951290 A	27-10-1999
		FR 2764803 A	24-12-1998
		PL 334277 A	14-02-2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Translation

PCT

67

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference I/BP/CC	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/02072	International filing date (day/month/year) 19 July 2000 (19.07.00)	Priority date (day/month/year) 20 July 1999 (20.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 35/74		
Applicant LABORATOIRES STANDA S.A.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>2</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 12 February 2001 (12.02.01)	Date of completion of this report 02 November 2001 (02.11.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages 1-21, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages 1-9, filed with the letter of 19 October 2001 (19.10.2001)
- ☒ the drawings:
pages 1/1, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-9	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: FR-A-2 741 509 (LABORATOIRES STANDA) 30 May 1997
(1997-05-30)

D2: WO 98 27991 A (LABORATOIRES STANDA) 2 July 1998 (1998-07-02)

D3: KANEKO T ET AL: JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, vol. 77, no. 2, 1 January 1994, pages 393-404

D4: MANTERE-ALHONEN, S. LAIT (1995), 75(4-5), 447-52

D5: CRESCI A ET AL: JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, 86, (2) 245-250, 1999.

Novelty (PCT Article 33(1) and (2))

The present application relates to the use of propionic bacteria selected (the ability to produce at least 2g/L of propionic acid) for producing a food or medicinal preparation which is active on the colon.

The different effects described in Claims 1-4 (production of propionic acid, promote the uptake of mineral salts, antifungal properties, adhesion to colonocytes) are inherent to the presence of propionic bacteria that are viable in the colon. Therefore, these effects are not

THIS PAGE BLANK (USPTO)

considered to be technical features capable of differentiating the application from the prior art.

The galenic features used in dependent Claims 5-9 are known from the prior art, without, however, being associated with strains selected for their ability to produce at least 2g/L of propionic acid.

However, selecting strains capable of producing at least 2g/L of propionic acid enables the subject matter of Claims 1-9 to be distinguished from the prior art.

Therefore, Claims 1-9 are considered to be novel.

Inventive step (PCT Article 33(1) and (3))

The present application relates to the use of slightly autolytic propionic bacteria selected for their ability to produce at least 2g/L of propionic acid for producing a food or medicinal preparation which is active on the colon.

The prior art describes the use of slightly autolytic propionic bacteria for producing a food or medicinal preparation which is active on the colon.

Therefore, the present invention consists in selecting strains which produce at least 2g/L of propionic acid from the propionic bacteria described in the prior art. However, using said selected strains does not lead to unexpected properties in relation to the use of propionic bacteria in general. Therefore, such a selection cannot be considered to be inventive. Therefore, the subject matter of Claims 1-9 does not involve an inventive step.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Industrial applicability (PCT Article 33(1) and (4))

Claims 1-9 relate to the use of bacteria selected for the preparation of food or medicinal compositions, and are therefore industrially applicable.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT



REC'D 07 NOV 2001

WIPO PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

157

Référence du dossier du déposant ou du mandataire I/BP/CC PCT 425	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/02072	Date du dépôt international (jour/mois/année) 19/07/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 20/07/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB A61K35/74		
Déposant LABORATOIRES STANDA S.A. et al.		
<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent 2 feuilles.</p>		
<p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priorité</p> <p>III <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale</p>		
Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 12/02/2001	Date d'achèvement du présent rapport 02.11.2001	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Pérez, F. N° de téléphone +49 89 2399 7338 	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02072

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-21 version initiale

Revendications, N°:

1-9 reçue(s) le 19/10/2001 avec la lettre du 19/10/2001

Dessins, feuilles:

1/1 version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02072

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-9
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications
	Non : Revendications 1-9
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-9
	Non : Revendications

**2. Citations et explications
voir feuille séparée**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Concernant le point V

Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

Il est fait référence aux documents suivants:

- D1: FR-A-2 741 509 (LABORATOIRES STANDA) 30 mai 1997 (1997-05-30)
- D2: WO 98 27991 A (LABORATOIRES STANDA) 2 juillet 1998 (1998-07-02)
- D3: KANEKO T ET AL: JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, vol. 77, no. 2, 1 janvier 1994, pages 393-404.
- D4: MANTERE-ALHONEN, S. LAIT (1995), 75(4-5), 447-52.
- D5: CRESCI A ET AL. JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, 86, (2) 245-250 1999

Nouveauté (Articles 33.1 et 33.2 PCT)

La présente demande couvre l'utilisation de bactéries propioniques sélectionnées (aptitude à produire au moins 2g/L d'acide propionique) pour l'obtention d'une préparation alimentaire ou médicamenteuse agissant au niveau du colon.

Les différents effets décrits dans les revendications 1-4 (production d'acide propionique, favoriser l'assimilation des sels minéraux, propriétés antifongiques, adhésion sur les colonocytes) sont indissociables de la présence de bactéries propioniques viables dans le colon. Ces effets ne sont donc pas considérées comme des caractéristiques techniques susceptibles de différencier la demande de l'art antérieur.

Les caractéristiques galéniques employées dans les revendications dépendantes 5-9 sont connues de l'art antérieur, sans toutefois être associées à des souches sélectionnées pour leur aptitude à produire au moins 2g/L d'acide propionique.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Seule, la sélection des souches capable de produire au moins 2 g/L d'acide propionique permet de distinguer l'objet des revendications 1-9 de l'art antérieur.

En conséquence, les revendications 1-9 sont considérées comme nouvelles.

Activité Inventive (Articles 33.1 et 33.3 PCT)

La présente demande couvre l'utilisation de bactéries propioniques peu autolytiques sélectionnées pour leur aptitude à produire au moins 2g/L d'acide propionique, pour l'obtention d'une préparation alimentaire ou médicamenteuse agissant au niveau du colon.

L'art antérieur décrit l'utilisation de bactéries propioniques peu autolitiques pour l'obtention d'une préparation alimentaire ou médicamenteuse agissant au niveau du colon.

La présente invention consiste donc à sélectionner l'utilisation des souches produisant au moins 2g/L d'acide propionique parmi les utilisations des bactéries propioniques décrite dans l'art antérieur. Toutefois, l'utilisation de ces souches sélectionnées ne présente pas de propriétés inattendues par rapport à l'utilisation des bactéries propioniques en général. Une telle sélection ne peut donc pas être considérée comme inventive. Par conséquent, l'objet des revendications 1-9 n'implique pas d'activité inventive.

Application Industrielle (Articles 33.1 et 33.4 PCT)

Les revendications 1-9 portent sur l'utilisation de bactéries sélectionnées pour la préparation de compositions alimentaires ou médicamenteuses et sont donc susceptibles d'application industrielle.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REVEN DICATIONS

1°) Utilisation de bactéries propioniques appartenant à des souches peu autolytiques et sélectionnées pour leur aptitude à produire au moins 2 g/l d'acide propionique et/ou de propionates et, de préférence, plus de 4 g/l d'acide propionique et/ou de propionates après avoir été cultivées à 30°C, dans un milieu YEL renfermant environ 11,4 g/l de lactate pendant 2 à 3 jours, puis diluées au 1/10^{ème} dans ce milieu YEL additionné de 0,6 % de bile de bœuf, incubées à 37°C pendant 90 minutes, centrifugées, reprises dans du milieu YEL et remises à incuber à 37°C pendant 24 heures, pour l'obtention d'une composition d'alimentation courante ou d'une composition diététique ou médicamenteuse absorbable par l'homme ou l'animal, élaborée pour que les bactéries soient protégées au moins partiellement vis-à-vis de l'acidité gastrique, renfermant au moins 10⁶ cellules par gramme de ces bactéries, susceptible de stimuler et d'augmenter de façon significative la synthèse d'acide propionique et/ou de propionates et le cas échéant d'acide acétique et/ou d'acétates au niveau du côlon par fermentation bactérienne anaérobie..

2°) Utilisation selon la revendication 1 pour l'obtention d'une composition susceptible de favoriser l'assimilation des principaux minéraux, en particulier du calcium et/ou du fer et/ou du zinc et/ou du magnésium au niveau du côlon.

3°) Utilisation selon la revendication 1, pour l'obtention d'une composition ayant des propriétés antifongiques au niveau du côlon et, en particulier, susceptible de réduire le développement de mycodermes pathogènes du type candida/muguet.

4°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que les bactéries propioniques appartiennent à des souches douées de propriétés d'adhésion sur les colonocytes.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4,
caractérisée en ce que
la composition est constituée par une préparation sèche ou
5 hydratée se présentant sous forme de fractions individuelles
d'environ 100 mg à 1 g de préférence de 200 à 500 mg, renfer-
mant de préférence au moins 10^8 cellules.

6°) Utilisation selon la revendication 5,
10 caractérisée en ce que
la composition se présente sous la forme de gélules ou de
capsules gastrorésistantes.

7°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à
15 6,
caractérisée en ce que
la composition est constituée par une préparation élaborée,
les bactéries propioniques étant ajoutées ou associées à un
substrat fermentescible, notamment à des fibres alimentaires.

20 8°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à
6,
caractérisée en ce que

la composition est constituée par une préparation élaborée,
25 les bactéries propioniques étant ajoutées ou incorporées dans
des aliments tels que des aliments liquides, pâteux ou soli-
des.

9°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à
30 7,
caractérisée en ce que
la composition renferme des bactéries lactiques et/ou des
bactéries bifides.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
25 janvier 2001 (25.01.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/05413 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷:
A61K 35/74, A23L 1/308, A61P 1/00, 31/00

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/02072

(22) Date de dépôt international: 19 juillet 2000 (19.07.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/09385 20 juillet 1999 (20.07.1999) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US): LAB-
ORATOIRES STANDA S.A. [FR/FR]; 68, rue Robert
Kaskoreff, F-14050 Caen Cedex (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): ROUSSEL,
Edmond, Daniel [FR/FR]; 16, rue St. Loup, F-14210 Ave-
nay (FR). LEGRAND, Charles, Gabriel [FR/FR]; Les
Ombrages N°3, 14, avenue de Creully, F-14000 Caen (FR).
LEGRAND, Marc, Henri [FR/FR]; 6, allée Beauséjour,
Le Vendome, F-14000 Caen (FR). ROLAND, Nathalie
[FR/FR]; Bâtiment A, 62, rue Papu, F-35000 Rennes (FR).
BOUGLE, Dominique [FR/FR]; 2, rue Robert Tournières,
F-14000 Caen (FR).

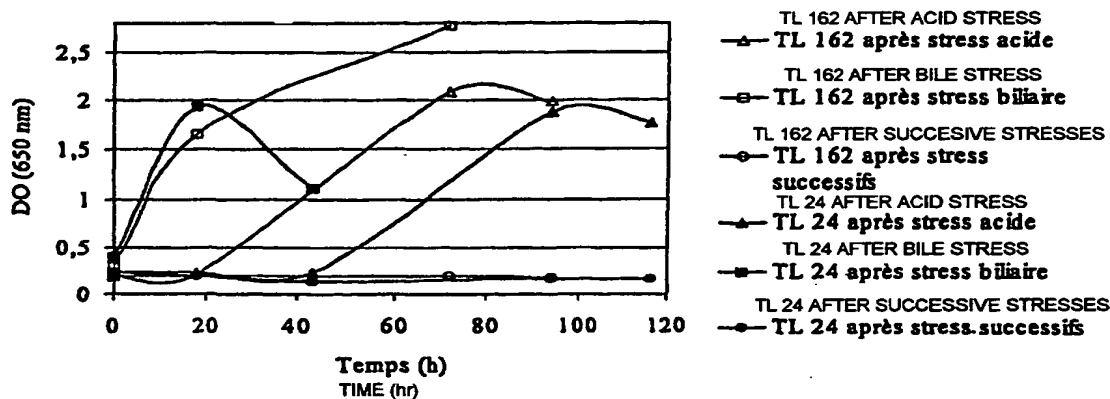
(74) Mandataire: CABINET HERRBURGER; 115, boule-
vard Haussmann, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: USE OF PROPIONIC BACTERIA FOR PRODUCING PROPIONIC ACID AND/OR PROPIONATES IN THE COLON

(54) Titre: UTILISATION DE BACTÉRIES PROPIONIQUES POUR LA PRODUCTION D'ACIDE PROPIONIQUE ET/OU DE
PROPIONATES DANS LE COLON



(57) Abstract: The invention concerns the use of propionic bacteria selected according to their low propensity to autolysis and their resistance to bile salts to obtain a current food composition or a dietetic composition of a medicine absorbable by a human or animal, prepared in such a way that the bacteria are well protected at least partially against gastric acidity, containing at least 10^6 cell/grams of said bacteria, capable of stimulating and increasing significantly the synthesis of propionic acid and/or propionate and, as the case may be, acetic acid and/or acetate at the colon by anaerobic bacterial fermentation.

(57) Abrégé: Utilisation de bactéries propioniques sélectionnées en fonction de leur caractère peu autolytique et de leur aptitude à résister aux sels biliaires pour l'obtention d'une composition d'alimentation courante ou d'une composition diététique ou médicamenteuse absorbable par l'homme ou l'animal, élaborée pour que les bactéries soient protégées au moins partiellement vis-à-vis de l'acidité gastrique, renfermant au moins 10^6 cellules/gramme de ces bactéries, susceptible de stimuler et d'augmenter de façon significative la synthèse d'acide propionique et/ou de propionate et le cas échéant d'acide acétique et/ou d'acétate au niveau du côlon par fermentation bactérienne anaérobie.

WO 01/05413 A1



PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

- Avec rapport de recherche internationale.
- Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

UTILISATION DE BACTERIES PROPIONIQUES POUR LA PRODUCTION D'ACIDE PROPIONIQUE
ET/OU DE PROPIONATES DANS LE COLON

5 La présente invention se rapporte à l'utilisation de bactéries propioniques en vue d'optimiser la production d'acide propionique et/ou de propionates et le cas échéant d'acide acétique et/ou d'acétates au niveau du côlon.

10 Depuis quelques années, les spécialistes nutritionnistes conseillent à leurs patients une alimentation riche en fibres auxquelles ils attribuent des effets physiologiques et métaboliques pouvant bénéficier à la santé.

15 Il est connu que les fibres alimentaires résistent à la digestion enzymatique dans l'intestin grêle et ne sont dégradées et assimilées qu'au niveau du côlon, c'est-à-dire de la partie terminale de l'intestin. L'effet bénéfique susmentionné ne peut donc s'exercer qu'à la condition que cette dégradation et cette assimilation soient aussi complètes que possibles à cet endroit préterminal : le côlon.

20 Or, on a pu établir que ces réactions biologiques sont consécutives à la fermentation anaérobie des fibres alimentaires sous l'action de micro-organismes dans le côlon. Cette fermentation aboutit à la production d'acides gras à chaîne courte (AGCC), d'hydrogène, de dioxyde de carbone et
25 de biomasse.

30 Ces acides gras à chaîne courte sont essentiellement l'acide acétique, l'acide propionique et l'acide butyrique ; dans l'organisme sain, ils ne peuvent être produits qu'au niveau du côlon, vu qu'il s'agit là du seul endroit du corps humain où règnent les conditions anaérobies strictes permettant la fermentation à la base de leur synthèse, à l'exception de l'acide acétique dont une très faible quantité peut être produite au niveau hépatique.

35 Or, différentes études ont prouvé l'importance de ces acides gras à chaîne courte qui sont bénéfiques à la santé.

 D'après la littérature, il semblerait que les rôles physiologiques de ces trois acides gras à chaîne courte

seraient différents les uns des autres : en effet, les acides acétiques et propioniques seraient directement conduits vers le foie où la totalité de l'acide propionique serait métabolisée alors qu'une partie de l'acide acétique serait ensuite
5 conduite à différents tissus, tandis que l'acide butyrique serait utilisé plus spécifiquement au niveau interne de la paroi colique.

La synthèse des acides gras à chaîne courte implique donc la présence dans le côlon, d'une part, d'un substrat à base de fibres facile à apporter par la nourriture et,
10 d'autre part, d'une flore bactérienne équilibrée et adaptée, présente de façon optimum et constante.

Cette flore bactérienne peut provenir soit de la flore endogène persistante de chaque individu, soit de
15 l'alimentation.

Il est, en effet, bien connu que le contenu du tube digestif humain qui est spécifique à chaque individu et correspond approximativement à 1 à 1,5 kg de matières alimentaires en cours de transformation digestive, renferme une importante population de micro-organismes constituée par un
20 mélange de nombreuses espèces pouvant être évaluée à 10^{11} à 10^{12} cellules par gramme dans le côlon ; cette population constitue une masse bactérienne d'un poids certain dont l'équilibre bon ou mauvais ne peut que difficilement être modifié radicalement et surtout durablement par le seul fait de
25 l'alimentation courante.

Par ailleurs, l'alimentation que l'on ingère journallement n'est jamais stérile et est donc plus ou moins chargée de bactéries (lait, produits laitiers fermentés, fromage, cidre, vin, bière, charcuterie, etc.). Les modifications de la flore colique consécutives à l'absorption de ces
30 bactéries ne peuvent toutefois être que temporaires.

Il est, en outre, à noter qu'il a déjà été proposé de tenter de modifier la population microbienne du tractus intestinal par l'administration et en particulier l'ingestion
35 volontaire de cellules bactériennes réputées bénéfiques à la santé (dites probiotiques) en particulier de bactéries lactiques ou de bactéries bifides.

L'introduction dans l'organisme d'une population importante de ces bactéries soit par le biais d'une alimentation particulière, soit par l'ingestion directe de ces cellules microbiennes, a plus particulièrement été proposée dans le but de limiter le développement des espèces pathogènes et putréfiantes : il est en effet connu que la flore endogène présente dans le côlon est répartie en différents groupes bactériens dont certains sont inoffensifs, voire bénéfiques, tandis que d'autres, en particulier des clostridium et des putréfiants conduisent à la production de substances toxiques et influencent négativement la santé.

L'idée à la base de l'invention a consisté à introduire régulièrement dans l'organisme, par voie buccale, une quantité importante d'une flore microbienne probiotique apte à favoriser la synthèse régulière d'acides gras à chaîne courte au niveau colique.

Parmi les espèces microbiennes pouvant être mises en œuvre à cet effet, les bactéries lactiques ne sont que peu adaptées puisque par leur nature, elles produisent surtout et avant tout de l'acide lactique et très secondairement un peu d'acide acétique mais pas d'acide propionique ni d'acide butyrique.

En revanche, des bactéries d'un autre type, les bactéries propioniques, sont capables de produire abondamment de l'acide propionique et de l'acide acétique donc, les deux acides gras à chaîne courte qui sont appelés à irriguer les réseaux tissulaires, ce par exemple selon un pourcentage de 2/3 d'acide propionique pour 1/3 d'acide acétique. Ces bactéries sont présentes en alimentation humaine depuis des siècles, en particulier dans les fromages à pâte pressée cuite ; de plus, elles présentent l'avantage d'être mieux armées que les bactéries lactiques pour avoir une activité dans le côlon où l'anaérobiose est totale, et par ailleurs, d'être plus résistantes aux stress technologiques que les bactéries lactiques et les bactéries bifides.

Il est à noter qu'il a déjà été proposé dans la littérature de faire absorber des bactéries propioniques, en particulier pour stimuler le développement des bactéries bi-

fides dans l'intestin (document WO-97/19689) ou encore pour dégager du monoxyde d'azote dans le tube digestif humain ou animal (document WO-98/27991). On n'avait cependant jusqu'à présent jamais eu l'idée d'utiliser ces bactéries pour la production d'acides gras à chaîne courte au niveau du côlon.

La présente invention concerne donc l'utilisation de bactéries propioniques sélectionnées en fonction de leur caractère peu autolytique et de leur aptitude à résister aux sels biliaires pour l'obtention d'une composition d'alimentation courante ou d'une composition diététique ou médicamenteuse absorbable par l'homme ou l'animal, élaborée pour que les bactéries soient protégées au moins partiellement vis-à-vis de l'acidité gastrique, renfermant au moins 10^6 cellules/gramme de ces bactéries, susceptible de stimuler et d'augmenter de façon significative la synthèse d'acide propionique et/ou de propionate et le cas échéant d'acide acétique et/ou d'acétate au niveau du côlon par fermentation bactérienne anaérobie.

Pour que ces bactéries puissent avoir l'effet bénéfique escompté, il est indispensable de choisir des souches peu autolytiques aptes à atteindre, sans dommage, le côlon, éventuellement à s'y développer et à produire des quantités suffisantes d'acide propionique.

Il est bien connu que les deux stress principaux, auxquels les bactéries ingérées sont soumises lors de leur passage dans la partie haute du tube digestif, sont liés, d'une part, à l'acidité du milieu stomacal (pH 4 à 1) et, d'autre part, à la présence de sels biliaires dans l'intestin grêle (de l'ordre de 15 mmol/l au maximum au niveau du duodénum).

Or, on a pu établir que des bactéries ayant été exposées à l'acidité stomacale sont fragilisées et par suite inaptes à résister aux sels biliaires, ce même si elles demeurent viables à la sortie de l'estomac.

Par suite, conformément à l'invention, il est indispensable de faire subir aux bactéries propioniques un traitement de nature à leur permettre de ne pas subir le stress gastrique correspondant en règle générale à une encap-

sulation qui peut être volontaire ou involontaire par exemple dans le cas d'un aliment de type fromage.

Cette situation a été mise en lumière grâce à un test par lequel on a évalué l'influence du pH acide et des sels biliaires successivement ou individuellement sur la viabilité de deux souches de bactéries propioniques laitières appartenant à la collection TL du LRTL (Laboratoire de Recherches de Technologie laitière - INRA de Rennes), à savoir les souches TL 162 et TL 24 appartenant à l'espèce *P. freudenreichii subsp shermanii*.

Les résultats de ce test sont décrits ci-dessous.

Les bactéries ont été cultivées à 30°C sur milieu YEL pendant 2 jours (début de phase stationnaire). La densité optique à 650 nm était respectivement de 2,28 et 2,64 pour TL 162 et TL 24.

- Stress acide

Les cultures ont été diluées au 1/10^{ème} dans du milieu S (tryptone-lactate) à pH 2,5 (pH final de 3,0). Après une incubation à 37°C pendant 45 min, les cultures ont été centrifugées et les bactéries reprises dans le même volume de YEL. Des numérations ont été faites avant et à la fin de l'incubation, et la reprise de la croissance a été suivie par des mesures de DO pendant 5 jours à 37°C.

- Stress biliaire

Les cultures initiales ont été centrifugées et les bactéries reprises dans un volume 10 fois supérieur de YEL contenant 0,3 % de bile de bœuf (à ~50 % de sels biliaires). Après une incubation à 37°C pendant 90 min, les cultures ont été centrifugées et les bactéries reprises dans le même volume de YEL. Des numérations ont été faites avant et à la fin de l'incubation, et la reprise de la croissance a été suivie par des mesures de DO pendant 5 jours à 37°C.

- Stress acide et biliaire successifs

Les bactéries ont subi un stress acide comme décrit précédemment, mais après centrifugation, les cellules ont été reprises dans du YEL contenant 0,3 % de bile. Après une deuxième incubation à 37°C pendant 90 min, les cultures ont été centrifugées et les bactéries reprises dans le même

volume de YEL. Des numérations ont été faites avant et à la fin des incubations et la reprise de la croissance a été suivie par des mesures de DO pendant 5 jours à 37°C.

Les résultats obtenus sont rapportés, d'une part, sur le tableau 1 ci-dessous qui mentionne l'influence des stress acide et/ou biliaire sur la viabilité des bactéries et, d'autre part, sur la figure 1 qui est un schéma représentant la reprise de la croissance après les différents stress.

10 **Tableau 1**

		Viabilité (cfu/ml)		
		Avant stress	Après stress acide	Après stress biliaire
Stress acide seul	TL 162	$3,0 \times 10^8$	$9,7 \times 10^6$	/
	TL 24	$4,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^7$	/
Stress biliaire seul	TL 162	$3,0 \times 10^8$	/	$4,4 \times 10^8$
	TL 24	$4,0 \times 10^8$	/	$4,7 \times 10^8$
Stress successifs	TL 162	$3,0 \times 10^8$	$9,7 \times 10^6$	2600
	TL 24	$4,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^7$	< 10

On a ainsi pu établir que :

- l'acidité entraîne une mortalité importante des bactéries (96,8 % pour TL 162 et 97,5 % pour TL 24), ce qui explique un délai assez long pour la reprise de la croissance (Figure 1).
- la bile n'entraîne aucune mortalité des bactéries, d'où une reprise très rapide de la croissance.
- lorsque l'on soumet les bactéries à la bile, après un stress acide préalable, cela conduit à une mortalité quasi totale des bactéries. Ce résultat, totalement inattendu, indique donc que des bactéries, qui ont subi un stress acide et qui toutefois restent viables, deviennent totalement sensibles à la bile alors que sans stress acide préalable, ces mêmes bactéries sont totalement résistantes aux sels biliaires.

Tenant compte de cette situation, on a effectué des essais de préadaptation dans le but d'augmenter la résistance des bactéries. On sait en effet qu'un pré-stress acide (pH 4,5-5) protège efficacement les cellules contre un stress acide (pH 2).

On a ainsi effectué trois essais d'adaptation sur TL 162 :

- *pré-stress acide* : incubation préliminaire des cellules à 37°C pendant 30 min à pH 5
- 10 - *pré-stress biliaire* : incubation pendant 30 min en présence de 0,08 % de bile
- *pré-stress acide et biliaire* : incubation pendant 30 min à pH 5 et en présence de 0,08 % de bile.

On a appliqué le même protocole que précédemment et obtenu les résultats rapportés dans le tableau 2 ci-dessous :

Tableau 2

	Viabilité (cfu/ml)	
	Avant stress	Après stress successifs
Sans préadaptation	3×10^8	2600
Préadaptation acide	3×10^8	100
Préadaptation biliaire	3×10^8	1400
Préadaptation acide et biliaire	3×10^8	< 100

On a ainsi pu établir qu'une préadaptation acide fragilise encore plus les cellules, alors qu'une préadaptation biliaire est sans effet.

Ces résultats ont donc permis de mettre en évidence la nécessité de traiter les stress successivement, et non pas séparément comme décrit dans la plupart des études qui ont été réalisées dans ce domaine.

On peut cependant supposer qu'in vivo les conditions sont moins drastiques pour les bactéries (effet tampon de l'aliment dans l'estomac, effet bactéricide moindre des

sels biliaires sous forme micellaire avec les phospholipides).

Compte tenu de ce qui précède, pour augmenter la quantité de bactéries viables, une amélioration de leur résistance au pH acide n'est pas efficace puisque les bactéries restent sensibles à l'effet des sels biliaires.

En revanche, en protégeant les bactéries du stress acide, en particulier en les ingérant préconditionnées dans des gélules gastrorésistantes, on peut retrouver dans les fèces des bactéries naturellement résistantes à la bile, ce à un niveau élevé de viabilité.

Compte tenu de ces résultats, on a effectué un test complémentaire pour comparer l'aptitude de différentes souches de bactéries propioniques à produire des quantités importantes d'acide propionique après avoir été mises en contact avec des sels biliaires.

Dans ce test, on a comparé 33 souches de bactéries propioniques laitières appartenant à la collection TL du LRTL (INRA de Rennes) selon leur aptitude à survivre en présence de bile et à produire ensuite de l'acide propionique :

- 20 souches appartenant à l'espèce *P. freudenreichii* subsp *shermanii*
- 6 souches appartenant à l'espèce *P. freudenreichii* subsp *freudenreichii*
- 7 souches appartenant à l'espèce *P. acidipropionici*

Le protocole opérationnel a été le suivant :

Des cultures en début de phase stationnaire (2 à 3 jours de culture en milieu YEL incubé à 30°C) ont été diluées au 1/10^{ème} dans du milieu YEL contenant 0,6 % de bile de bœuf (environ 7-8 mmol/l de sels biliaires). Cette concentration en bile a été choisie de façon à discriminer au mieux les souches entre elles et constitue des teneurs en sels biliaires du même ordre que celles rencontrées dans le duodénum.

Les dilutions ont été incubées à 37°C pendant 90 min, puis centrifugées. Les bactéries ont été reprises dans du milieu YEL (volume initial) et remises à incuber à 37°C.

Après 24 h d'incubation, la DO à 650 nm a été mesurée pour évaluer la reprise de la croissance. Le surnageant a été récolté puis congelé pour doser les acides gras.

Pour certaines souches, l'expérience a été renouvelée de façon à confirmer les résultats.

Les valeurs des densités optiques à 650 nm avant le stress biliaire et 24 h après la fin du stress sont rapportées dans le tableau 3 ci-dessous :

Tableau 3

Souches :	DO avant le stress biliaire (DO initiale/10)	DO à 24 h d'incubation après le stress biliaire	% de DO à 24 h/DO initiale
<i>P. shermanii</i>			
TL 125	0,32	2,02	63
TL 134	0,29 - 0,26	2,60 - 2,04	90 - 78
TL 144	0,39	3,62	93
TL 146	0,27	1,56	58
TL 147	0,28	1,23	44
TL 148	0,23	0,04	2
TL 160	0,36 - 0,32	4,67 - 4,03	130 - 126
TL 167	0,26	1,05	40
TL 168	0,32	0,57	18
TL 4	0,32	0,29	9
TL 14	0,23	0,73	32
TL 17	0,29	0,55	19
TL 22	0,28	1,39	50
TL 24	0,28	1,65	59
TL 162	0,20	2,08	104
TL 34	0,26 - 0,27	3,40 - 3,87	131 - 143
TL 50	0,26	2,05	79
TL 61	0,23	1,31	57
TL 63	0,27 - 0,26	3,26 - 3,55	121 - 137
TL 40	0,30	1,46	49
<i>P. freundenreichi</i>			
TL 142	0,34 - 0,31	2,95 - 2,80	87 - 90
TL 3	0,24	2,66	111
TL 19	0,30	2,66	89
TL 37	0,23	1,79	78
TL 33	0,26	2,38	92
TL 64	0,29	0,31	11
<i>P. acidipropionici</i>			
TL 2	0,38	2,30	61
TL 9	0,34	2,29	67
TL 15	0,34	3,09	91
TL 54	0,34	1,39	41
TL 47	0,20	0,22	11
TL 223	0,29 - 0,38	2,59 - 2,91	89 - 77
TL 249	0,44	3,40	77

Il est à noter que pour certaines souches, la DO finale est supérieure à la DO initiale, ce qui peut

s'expliquer par la croissance reprise à 37°C et non à 30°C comme initialement.

En fonction des résultats obtenus, on peut schématiquement distinguer trois groupes de souches :

- 5 - les souches se distinguant par une reprise rapide de la croissance, indiquant une faible mortalité des cellules due à la bile (parmi elles TL 34, TL 160, TL 63, TL 33, TL 15, TL 3, TL 162),
- des souches très peu résistantes à la bile, présentant une
10 reprise de la croissance très faible ou nulle (TL 148, TL 4, TL 64, TL 47),
- des souches intermédiaires, caractérisées par une mortalité modérée due à la bile (TL 146, TL 147, TL 167, TL 168, TL 14, TL 17, TL 22, TL 24, TL 61, TL 40, TL 54).

15 Seules les souches possédant un ratio $[(DO \text{ à } 24 \text{ h} / DO \text{ initiale}) \times 100]$ supérieur à 60 % (seuil choisi arbitrairement) ont été sélectionnées pour la mesure du lactate, de l'acétate et du propionate par HPLC dans les surnageants congelés. La teneur initiale du milieu YEL en lactate était
20 de 11,4 g/l.

Les concentrations en lactate, acétate et propionate des surnageants récupérés après 24 h d'incubation, sont rassemblées dans le tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4

Souches :	Lactate consommé	Acétate produit	Propionate produit
	(en g/l)		
<i>P. shermanii</i>			
TL 125	5,6	0,6	2,4
TL 134	8,9 - 7,3	0,9 - 0,9	4,0 - 3,4
TL 144	8,8	1,1	4,6
TL 160	9,9 - 8,8	1,3 - 1,1	4,7 - 4,6
TL 162	5,3	0,6	2,3
TL 34	9,7 - 10,1	1,0 - 1,2	4,9 - 4,7
TL 50	6,6	0,6	3,7
TL 63	9,1 - 10,0	1,0 - 1,1	4,4 - 4,4
<i>P. freundenreichi</i>			
TL 142	8,1 - 8,2	0,9 - 0,9	4,5 - 4,0
TL 3	7,8	0,9	3,6
TL 19	6,6	0,7	3,7
TL 37	5,5	0,6	2,5
TL 33	7,2	0,8	3,4
<i>P. acidipropionici</i>			
TL 2	2,7	0,4	1,5
TL 9	5,3	0,6	2,4
TL 15	3,7	0,4	2,0
TL 223	2,8 - 3,8	0,4 - 0,4	1,8 - 1,7
TL 249	5,2	0,6	3,2

Ce tableau montre que de manière prévisible, la quantité de propionate produit est corrélée avec le degré d'utilisation du lactate.

D'une façon générale, les souches appartenant à l'espèce *P. acidipropionici* produisent moins d'acide propionique que les souches de l'espèce *P. freundenreichii* en 24 h.

Au vu des résultats rapportés ci-dessus, certaines souches s'avèrent être de meilleurs candidats en matière de production de propionate après l'action de la bile. Il s'agit des souches produisant au moins 2 g/l de propionate dans les conditions décrites ci-dessus :

TL 134, TL 50, TL 3, TL 19, TL 33, TL 249,
et de préférence plus de 4 g/l de propionate :

TL 160, TL 144, TL 34, TL 63, TL 142.

Une expérimentation a par ailleurs été réalisée sur des volontaires sains, dans le but de vérifier l'influence bénéfique des gélules gastro-résistantes pour améliorer la survie dans l'intestin d'une souche de bactérie propionique fromagère ingérée sous forme lyophilisée (TL 162).

L'expérience a été réalisée sur 7 individus au total, avec 3 périodes de traitement de 4 semaines, séparées par 3 semaines d'intervalle.

10 Le traitement 1 consistait à ingérer pendant 2 semaines 5×10^9 cfu/j de bactéries, conditionnées en gélules non gastrorésistantes.

Le traitement 2 consistait à ingérer pendant 2 semaines 5×10^{10} cfu/j de bactéries, conditionnées en gélules non gastrorésistantes.

15 Le traitement 3 consistait à ingérer pendant 2 semaines 5×10^9 cfu/j de bactéries, conditionnées en gélules gastro-résistantes.

Pour chaque traitement, 4 prélèvements de fèces ont été réalisés pour rechercher les bactéries propioniques à l'aide d'un milieu sélectif (Palpropionbac®, Standa-Industrie, additionné de 4 mg/l de métronidazole). Les dates de prélèvements étaient :

- S1 : juste avant la période d'ingestion,
- 25 - S2 : 1 semaine après le début de l'ingestion,
- S3 : 2 semaines après le début de l'ingestion,
- S4 : 1 semaine après la fin de la période d'ingestion,
- HP (pour la période 3) : 3 semaines après la fin de la période d'ingestion.

30 Pendant toute l'expérience, les volontaires ne pouvaient pas consommer de fromage contenant des bactéries propioniques en quantité importante (Emmental, Comté, Leerdammer, Gruyères Suisses, ...), à l'exception des fromages fondus.

35 Le tableau 5 indique les résultats de viabilité des bactéries propioniques dans les fèces.

Avec des gélules classiques, la dose de 5×10^9 cfu/j (Période 1) apparaît insuffisante pour retrou-

ver des bactéries propioniques viables en quantité importante chez tous les volontaires. Par contre, avec la dose de 5×10^{10} cfu/j (Période 2), tous les volontaires hébergent plus de 5 log cfu/g de bactéries propioniques viables dans les fèces, dès la première semaine de traitement. Toutefois, les niveaux maximum de viabilité observés avec les doses ne sont pas différentes (~ 7 log).

L'utilisation de gélules gastro-résistantes (Période 3) améliore la viabilité des bactéries propioniques dans les fèces, notamment chez les volontaires chez qui on en retrouvait peu lors du 1^{er} traitement (vol. 1, 2 et 6). En fait, par rapport à la Période 2, les niveaux de viabilité obtenus sont en moyenne équivalents.

- sur la base de 5×10^9 cfu/j, l'utilisation des gélules gastro-résistantes se justifie donc pour un certain nombre d'individus (vol. 1, 2, 6), pour les autres elles n'améliorent pas ou peu la viabilité (vol. 3, 4 et 5),
- elles apportent des résultats à peu près équivalents à des gélules classiques contenant 5×10^{10} cfu.

Les AGCC ont été mesurés dans les fèces par chromatographie en phase gazeuse. Les quantités de propionate dans les fèces sont indiquées dans le tableau 6. Pour l'analyse statistique, 2 groupes de valeurs ont été comparées 2 à 2 : les valeurs correspondantes aux échantillons de fèces où les bactéries propioniques n'étaient pas détectées (< 4 log), pour tous traitements et périodes confondus et les valeurs correspondantes aux échantillons de fèces où les bactéries propioniques ont été numérées à plus de 6 log cfu/g. Dans le premier cas, la quantité moyenne de propionate est de $5,06 \pm 2,56$ $\mu\text{mol/g}$ ($n = 25$) et dans le second cas, elle est de $7,19 \pm 3,18$ $\mu\text{mol/g}$ ($n = 30$). Ces 2 valeurs sont significativement différentes à $p < 0,02$ (test de Student). Pour les autres AGCC, il n'y a pas de différences significatives. Cette expérience montre donc que la présence de quantités importantes (> 6 log cfu/g) de bactéries propioniques dans le côlon consécutive à l'ingestion de TL 162 augmente significativement la quantité de propionate dans les fèces. Toutefois la souche TL 162 ne s'avérant pas le meilleur candidat pour

optimiser la production d'acide propionique dans le côlon (cf critères de sélection *in vitro*), il est vraisemblable que les résultats puissent être améliorés avec une souche sélectionnée selon les critères précités.

Tableau 5 : Numération des bactéries propioniques dans les fèces lors des 3 périodes de traitement
(résultats en log cfu/g de fèces fraîches)

	Vol. 1	Vol. 2	Vol. 3	Vol. 4	Vol. 5	Vol. 6	Vol. 7	moyenne	s	n*
Période 1	S1	4,00	< 4	< 4	< 4	4,85	4,30	4,29	0,40	4/7
	S2	4,00	< 4	4,70	6,00	4,85	5,68	5,40	1,12	6/7
	S3	5,88	4,00	6,85	6,08	4,70	6,76	5,79	1,07	7/7
	S4	< 4	< 4	< 4	6,11	< 4	5,00	5,86	0,77	3/7
Période 2	S1	6,46	< 4	6,43	6,30	< 4		6,40	0,09	3/5
	S2	5,83	5,40	6,69	6,32	7,20		6,29	0,71	5/5
	S3	6,36	6,46	6,83	6,36	5,00		6,20	0,70	5/5
	S4	5,11	< 4	< 4	< 4	6,11		5,61	0,71	2/5
Période 3	S1	3,85	< 3	6,15	< 4	6,38	< 3	5,46	1,40	3/6
	S2	6,51	5,43	4,95	6,79	6,81	5,68	6,03	0,78	6/6
	S3	6,56	5,77	6,70	6,23	6,11	5,95	6,22	0,35	6/6
	S4	5,26	< 3	< 3	6,80	< 3	5,89	5,98	0,78	3/6
	HP	4,60	< 2	2,77	6,23	7,30	< 2	5,23	1,98	4/6

n* = nombre d'individus chez qui les bactéries propioniques ont pu être numérées
cellules grisées : ensemble des valeurs supérieures à 6 log cfu/g.

Tableau 6 : concentration en propionate dans les fèces fraîches (en $\mu\text{mol/g}$)

	Vol. 1	Vol. 2	Vol. 3	Vol. 4	Vol. 5	Vol. 6	Vol. 7
Période 1	S1	7,70	4,82	3,73	2,38	3,70	13,83
	S2	10,03	3,61	5,43	5,32	3,86	18,08
	S3	9,44	3,88	2,29	4,35	7,99	12,01
	S4	6,00	2,60	3,68	8,40	5,17	10,45
Période 2	S1	9,56	7,36	13,77	8,49	6,14	
	S2	7,12	1,86	7,26	5,82	3,72	
	S3	10,60	5,11	3,99	6,42	4,83	
	S4	19,16	3,12	3,58	2,16	7,68	
Période 3	S1	11,90	5,05	10,82	3,43	13,45	2,04
	S2	9,29	8,34	7,82	6,45	3,28	7,56
	S3	10,91	6,62	10,60	7,72	4,99	2,25
	S4	11,93	2,89	8,91	3,47	6,15	5,20
	HP		3,58			6,57	6,49

cellules grisées : ensemble des valeurs correspondant aux échantillons avec les bactéries propioniques supérieures à 6 log cfu/g

Compte tenu de ce qui précède et conformément à une caractéristique préférentielle de l'invention, les bactéries propioniques utilisées sont choisies parmi les souches produisant de l'acide propionique en quantité physiologiquement significative et en particulier parmi les souches produisant au moins 2 g/l d'acide propionique et/ou de propionates et, de préférence, plus de 4 g/l d'acide propionique et/ou de propionates après avoir été cultivées à 30°C, dans du milieu YEL renfermant environ 11,4 g/l de lactate pendant 2 à 3 jours, puis diluées au 1/10^{ème} dans un milieu YEL contenant 0,6 % de bile de bœuf, incubées à 37°C pendant 90 min, centrifugées, reprises dans du milieu YEL et remises à incuber à 37°C pendant 24 heures.

Un autre critère de sélection pouvant être pris en compte conformément à l'invention correspond aux propriétés d'adhésion des souches sur les colonocytes : des souches douées de bonnes propriétés d'adhésion présentent en effet l'avantage de demeurer plus longtemps dans le côlon, ce qui leur laisse plus de temps pour synthétiser l'acide propionique ; de plus, les souches qui se fixent, peuvent prendre la place des agents pathogènes.

Il est à noter que pour obtenir l'effet recherché, il n'est pas envisageable de faire absorber l'acide propionique lui-même vu que du fait de la chaîne métabolique humaine il ne pourrait pas parvenir au côlon et que, de plus, il a été montré qu'il est nocif à haute dose pour l'estomac.

Parmi les effets bénéfiques attribués aux acides gras à chaîne courte synthétisés au niveau du côlon et en particulier à l'acide acétique et surtout à l'acide propionique, on peut noter leur rôle au niveau de l'assimilation des principaux minéraux et notamment du calcium, du fer, du zinc ou encore du magnésium ; on a en effet pu établir que l'acide propionique et, dans une moindre mesure, l'acide acétique peut favoriser l'absorption colique de ces minéraux et l'utilisation par l'organisme de la fraction absorbée.

Il s'agit là d'un effet particulièrement intéressant vu que l'assimilation des minéraux s'accompagne d'effets fonctionnels tels qu'à titre d'exemple la correction de

l'anémie pour le fer ou la minéralisation osseuse pour le calcium.

Les études expérimentales et cliniques, qui ont été effectuées, fournissent un faisceau d'arguments concordants à l'appui d'un effet favorable de l'acide propionique et des propionates et, dans une moindre mesure, de l'acide acétique et des acétates sur le métabolisme de ces minéraux ; cet effet est vraisemblablement plus important lorsque les conditions de digestion sont mauvaises, ce qui conduit à amener une quantité importante de minéraux non absorbés par l'intestin grêle au niveau colique, et lorsque les besoins sont élevés.

L'existence de relations entre les acides gras à chaîne courte et le métabolisme des minéraux a notamment été suggérée par des études ayant utilisé des fibres solubles. On a ainsi pu établir que les polysaccharides ou oligosaccharides non digérés par les enzymes digestives et qui sont donc fermentés en acides gras à chaîne courte (notamment en propionates) par la flore colique augmentent l'absorption des minéraux tels que le calcium, le fer ou le zinc et que cette augmentation est d'autant plus nette que les conditions sont pathologiques (carences, gastrectomie ...).

Des études de perfusion colique et a contrario l'absence d'effet chez des sujets côlectomisés a permis de confirmer la localisation du site d'action au niveau colique.

Il a en outre été constaté que ces actions s'accompagnent d'une baisse du pH et d'une synthèse d'acides gras à chaîne courte ; ceci suggère l'intervention de ces acides par le biais d'une fermentation, ce d'autant plus que l'on a vérifié que les fibres insolubles, non fermentescibles, n'ont pas d'effet. De plus, il a été établi que le cæcum est hypertrophié et que le débit sanguin colique augmente, ce qui témoigne d'un effet trophique.

Les études cliniques effectuées sur ce sujet sont peu nombreuses, mais permettent de confirmer que les effets des fibres solubles sont obtenus par fermentation colique et de montrer directement l'effet des acides gras à chaîne courte sur l'absorption des minéraux.

Parmi ces études, on peut mentionner la publication « *Trinidad TP, Wolever TMS, Thompson LU, Effect of acetate and propionate on calcium absorption from the rectum and distal colon of humans. Am J Clin Nutr 1996, 63/ 574-578* »
5 qui rend compte d'essais dans lesquels on a perfusé directement le côlon distal de sujets sains avec de l'acide acétique, de l'acide propionique ou leur association à concentration physiologique ; on a ainsi établi que la disparition du calcium de la lumière colique est augmentée par les
10 deux acides gras à chaîne courte, mais de façon significativement plus importante par l'acide propionique ; cette étude a également montré un effet dose à l'appui d'un système d'absorption non saturable. Les auteurs ont suggéré que la plus grande lipophilie de l'acide propionique comparé à
15 l'acide acétique pourrait favoriser son absorption et la libération dans le colonocyte de protons dont le passage dans la lumière digestive favoriserait l'absorption du calcium.

Compte tenu de ce qui précède, l'invention concerne également l'utilisation de bactéries propioniques
20 sélectionnées en fonction de leur caractère peu autolytique et de leur aptitude à résister aux sels biliaires pour l'obtention d'une composition d'alimentation courante ou d'une composition diététique ou médicamenteuse absorbable par l'homme ou l'animal, élaborée pour que les bactéries soient
25 protégées au moins partiellement vis-à-vis de l'acidité gastrique, renfermant au moins 10^6 cellules/gramme de ces bactéries, susceptible de favoriser l'assimilation des principaux minéraux, en particulier du calcium et/ou du fer et/ou du zinc et/ou du magnésium au niveau du côlon.

30 Selon une variante de l'invention, il est également proposé d'appliquer cette utilisation à l'obtention d'une composition ayant des propriétés antifongiques au niveau du côlon et, en particulier, susceptible d'y réduire le développement de mycodermes pathogènes du type *candida/muguet*.
35

Cette utilisation conduit, en fait à tirer profit des excellentes propriétés antifongiques de l'acide propioni-

que notamment pour le traitement des candidoses dues aux antibiotiques.

Il est à noter que la composition utilisée conformément à l'invention peut, le cas échéant, renfermer des bactéries autres, en particulier des bactéries lactiques et/ou des bactéries bifides susceptibles d'agir en synergie avec les bactéries propioniques de façon à augmenter les effets susmentionnés en leur fournissant du lactate en tant que substrat fermentescible.

La composition utilisée conformément à l'invention peut être constituée par une préparation sèche ou hydratée se présentant sous forme de fractions individuelles d'environ 100 mg à 1 g, de préférence de 200 à 500 mg, renfermant de préférence au moins 10^8 cellules ; elle peut en particulier avantageusement se présenter sous la forme de gélules ou de capsules gastrorésistantes.

Selon une autre caractéristique de l'invention, cette composition peut également être constituée par une préparation élaborée, les bactéries propioniques étant ajoutées ou associées à un substrat fermentescible notamment à des fibres alimentaires ou encore ajoutées ou incorporées dans des aliments liquides, pâteux ou solides.

Dans une telle préparation, les bactéries propioniques peuvent jouer un double rôle, à savoir technologique dans un premier temps à travers la fermentation d'aliments et fonctionnel dans un second temps, puisqu'une fois ingérées, elles sont capables d'atteindre le côlon et d'y jouer le rôle probiotique susmentionné, en particulier au niveau de l'optimisation de la synthèse d'acide propionique et de l'optimisation de l'assimilation des minéraux.

R E V E N D I C A T I O N S

1°) Utilisation de bactéries propioniques sélectionnées en fonction de leur caractère peu autolytique et de leur aptitude à résister aux sels biliaires pour l'obtention d'une composition d'alimentation courante ou d'une composition dié-
tétique ou médicamenteuse absorbable par l'homme ou l'animal, élaborée pour que les bactéries soient protégées au moins partiellement vis-à-vis de l'acidité gastrique, renfermant au moins 10^6 cellules/gramme de ces bactéries, susceptible de stimuler et d'augmenter de façon significative la synthèse d'acide propionique et/ou de propionate et le cas échéant d'acide acétique et/ou d'acétate au niveau du côlon par fermentation bactérienne anaérobie.

2°) Utilisation de bactéries propioniques sélectionnées en fonction de leur caractère peu autolytique et de leur aptitude à résister aux sels biliaires pour l'obtention d'une composition d'alimentation courante ou d'une composition dié-
tétique ou médicamenteuse absorbable par l'homme ou l'animal, élaborée pour que les bactéries soient protégées au moins partiellement vis-à-vis de l'acidité gastrique, renfermant au moins 10^6 cellules/gramme de ces bactéries, susceptible de favoriser l'assimilation des principaux minéraux, en particulier du calcium et/ou du fer et/ou du zinc et/ou du magnésium au niveau du côlon.

3°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 et 2,

caractérisée en ce que

les bactéries propioniques utilisées sont choisies parmi les souches produisant de l'acide propionique en quantité importante et physiologiquement significative.

4°) Utilisation selon la revendication 3,

caractérisée en ce que

les bactéries propioniques utilisées sont choisies parmi les souches produisant au moins 2 g/l d'acide propionique et/ou de propionates et, de préférence, plus de 4 g/l d'acide pro-

pionique et/ou de propionates après avoir été cultivées à 30°C, dans du milieu YEL renfermant environ 11,4 g/l de lactate pendant 2 à 3 jours, puis diluées au 1/10^{ème} dans du milieu contenant 0,6 % de bile de bœuf, incubées à 37°C pendant 90 min, centrifugées, reprises dans du milieu YEL et remises à incuber à 37°C pendant 24 heures.

5°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, pour l'obtention d'une composition ayant des propriétés antifongiques au niveau du côlon et, en particulier, susceptible de réduire le développement de mycodermes pathogènes du type candida/muguet.

6°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que les bactéries propioniques appartiennent à des souches douées de propriétés d'adhésion sur les colonocytes.

7°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que la composition est constituée par une préparation sèche ou hydratée se présentant sous forme de fractions individuelles d'environ 100 mg à 1 g de préférence de 200 à 500 mg, renfermant de préférence au moins 10⁸ cellules.

8°) Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que la composition se présente sous la forme de gélules ou de capsules gastrorésistantes.

9°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que la composition est constituée par une préparation élaborée, les bactéries propioniques étant ajoutées ou associées à un substrat fermentescible, notamment à des fibres alimentaires.

10°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8,

caractérisée en ce que

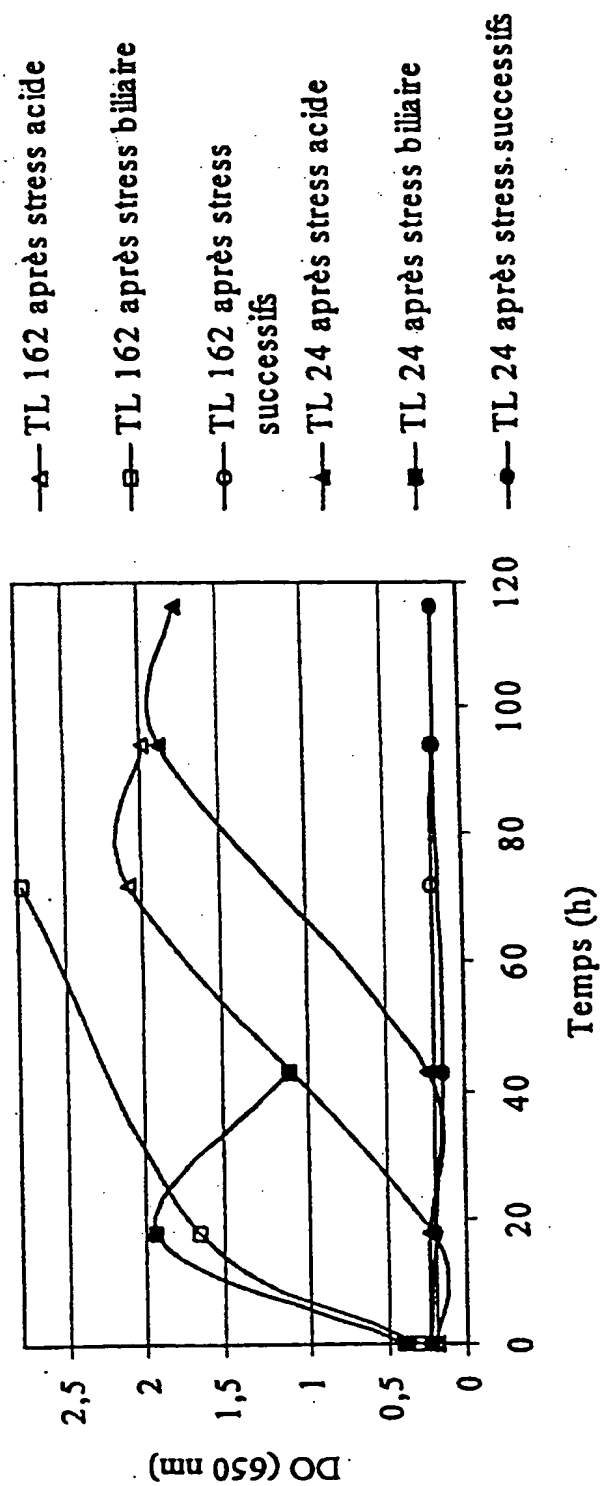
la composition est constituée par une préparation élaborée,
5 les bactéries propioniques étant ajoutées ou incorporées dans des aliments tels que des aliments liquides, pâteux ou solides.

11°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 9,

caractérisée en ce que

la composition renferme des bactéries lactiques et/ou des bactéries bifides.

Figure 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/02072

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K35/74 A23L1/308 A61P1/00 A61P31/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K A23C A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 741 509 A (LABORATOIRES STANDA) 30 May 1997 (1997-05-30) page 12 -page 13	1
A	WO 98 27991 A (LABORATOIRES STANDA) 2 July 1998 (1998-07-02) page 27 -page 28 -/-	1-11



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 December 2000

Date of mailing of the international search report

04/01/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/02072

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KANEKO T ET AL: "GROWTH STIMULATOR FOR FIFIDOBACTERIA PRODUCED BY PROPIONIBACTERIUM FREUDENREICHII AND SEVERAL INTESTINAL BACTERIA" JOURNAL OF DAIRY SCIENCE,US,AMERICAN DAIR SCIENCE ASSOCIATION. CHAPAIN, ILLINOIS, vol. 77, no. 2, 1 January 1994 (1994-01-01), pages 393-404, XP000590802 ISSN: 0022-0302 the whole document	1-11
X	----- DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; MANTERE-ALHONEN, S.: "Propionibacteria used as probiotics - a review" retrieved from STN Database accession no. 124:143825 HCA XP002139247 abstract & LAIT (1995), 75(4-5), 447-52,	1-11
A	----- DATABASE FSTA 'Online! INTERNATIONAL FOOD INFORMATION SERVICE (IFIS), FRANKFURT/MAIN, DE; CRESCI A ET AL: "The effect of sucrose or starch-based diet on short-chain fatty acids and faecal microflora in rats." Database accession no. 1999-00-a0963 XP002139248 abstract & JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, 86,(2) 245-250 1999 -----	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

...ormation on patent family members

Interr Application No

PCT/FR 00/02072

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2741509 A	30-05-1997	FR 2741510 A	30-05-1997
		AU 7699696 A	19-06-1997
		BR 9611609 A	28-12-1999
		CA 2235709 A	05-06-1997
		EP 0863763 A	16-09-1998
		WO 9719689 A	05-06-1997
		JP 2000502247 T	29-02-2000
		PL 326982 A	09-11-1998
WO 9827991 A	02-07-1998	FR 2764801 A	24-12-1998
		FR 2764802 A	24-12-1998
		AU 5669098 A	17-07-1998
		BR 9714179 A	29-02-2000
		CN 1245432 A	23-02-2000
		EP 0951290 A	27-10-1999
		FR 2764803 A	24-12-1998
		PL 334277 A	14-02-2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 00/02072

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 A61K35/74 A23L1/308 A61P1/00 A61P31/00		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 A61K A23C A23L		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, CHEM ABS Data, FSTA		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 741 509 A (LABORATOIRES STANDA) 30 mai 1997 (1997-05-30) page 12 -page 13	1
A	WO 98 27991 A (LABORATOIRES STANDA) 2 juillet 1998 (1998-07-02) page 27 -page 28 -/-	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *&* document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 28 décembre 2000		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 04/01/2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Moreau, J

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>KANEKO T ET AL: "GROWTH STIMULATOR FOR FIFIDOBACTERIA PRODUCED BY PROPIONIBACTERIUM FREUDENREICHII AND SEVERAL INTESTINAL BACTERIA"</p> <p>JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, US, AMERICAN DAIRY SCIENCE ASSOCIATION. CHAPAIN, ILLINOIS, vol. 77, no. 2, 1 janvier 1994 (1994-01-01), pages 393-404, XP000590802</p> <p>ISSN: 0022-0302</p> <p>le document en entier</p> <p>---</p>	1-11
X	<p>DATABASE CHEMABS 'en ligne!</p> <p>CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US;</p> <p>MANTERE-ALHONEN, S.: "Propionibacteria used as probiotics - a review"</p> <p>retrieved from STN</p> <p>Database accession no. 124:143825 HCA</p> <p>XP002139247</p> <p>abrégé</p> <p>& LAIT (1995), 75(4-5), 447-52,</p> <p>---</p>	1-11
A	<p>DATABASE FSTA 'en ligne!</p> <p>INTERNATIONAL FOOD INFORMATION SERVICE (IFIS), FRANFURT/MAIN, DE;</p> <p>CRESCI A ET AL: "The effect of sucrose or starch-based diet on short-chain fatty acids and faecal microflora in rats."</p> <p>Database accession no. 1999-00-a0963</p> <p>XP002139248</p> <p>abrégé</p> <p>& JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY,</p> <p>86,(2) 245-250 1999</p> <p>-----</p>	1-11

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 00/02072

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2741509 A	30-05-1997	FR 2741510 A	30-05-1997
		AU 7699696 A	19-06-1997
		BR 9611609 A	28-12-1999
		CA 2235709 A	05-06-1997
		EP 0863763 A	16-09-1998
		WO 9719689 A	05-06-1997
		JP 2000502247 T	29-02-2000
		PL 326982 A	09-11-1998
WO 9827991 A	02-07-1998	FR 2764801 A	24-12-1998
		FR 2764802 A	24-12-1998
		AU 5669098 A	17-07-1998
		BR 9714179 A	29-02-2000
		CN 1245432 A	23-02-2000
		EP 0951290 A	27-10-1999
		FR 2764803 A	24-12-1998
		PL 334277 A	14-02-2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)